·论著·

前列腺小体 miRNA-146a/TLR-4/NF-κB 通路在 EAP 大鼠慢性炎症中的作用及大火草干预的研究

陆良喜[1]，史宏[1]，黄志敏[2]，王文杰[1]，邹涵[3]，张知英[3]，吴金玉[2*]

【摘要】 背景 目前对慢性前列腺炎（CP）的治疗未达到预期的疗效，亟需寻找新的治疗药物，本课题组前期的临床研究发现大火草〔Anemone tomentosa （Maxim.）Pei〕对 CP 有较好的疗效，但具体作用机制还有待进一步研究。**目的** 探讨前列腺小体源性微小 RNA-146a（miRNA-146a）调控 Toll 样受体 4（TLR-4）/ 核转录因子 κB（NF-κB）通路在自身免疫性前列腺炎（EAP）大鼠慢性炎症中的作用及大火草干预的可能机制。**方法** 2021 年 12 月至 2022 年 6 月，将 42 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为 7 组，包括正常组、模型组、大火草低剂量组、大火草中剂量组、大火草高剂量组、miRNA-146a 激动剂（mimics）组、miRNA-146a 抑制剂（inhibitor）组，每组 6 只。药物干预后，采用实时荧光定量聚合酶链式反应（RT-PCR）检测前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA，采用蛋白质印迹法（WB）检测 TLR-4、细胞内抑制性蛋白 κB（IκB）、磷酸化细胞内抑制性蛋白 κB（p-IκB）、肿瘤坏死因子受体相关因子 6（TRAF6），酶联免疫吸附剂测定法（ELISA）检测炎症因子。**结果** 与正常组比较，各组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达均下调（$P<0.01$）。与模型组比较，大火草中、高剂量组，miRNA-146a mimics 组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达均上调（$P<0.01$）；miRNA-146a inhibitor 组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达下调（$P<0.01$）。大火草和 miRNA-146a mimics 可以显著降低前列腺组织 TLR-4、p-IκBα、TRAF6 蛋白表达（$P<0.01$）；促进前列腺组织 IκBα 蛋白表达上调（$P<0.01$）；降低大鼠血清中肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白介素-6（IL-6）、白介素-8（IL-8）、干扰素-γ（IFN-γ）水平（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）。大火草和 miRNA-146a mimics 可以减轻前列腺组织炎症细胞浸润，改善前列腺组织病理损伤。**结论** 前列腺小体源性 miRNA-146a 可以调节 TLR-4/NF-κB 通路活化参与 EAP 大鼠前列腺局部病理变化。大火草抗 EAP 大鼠慢性炎症的作用机制可能与其调控前列腺小体源性 miRNA-146a/TLR-4/NF-κB 通路有关。

【关键词】 慢性前列腺炎；前列腺小体；微小 RNA-146a；Toll 样受体 4；核转录因子-κB

【中图分类号】 R 697.33 【文献标志码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0731

陆良喜，史宏，黄志敏，等. 前列腺小体 miRNA-146a/TLR-4/NF-κB 通路在 EAP 大鼠慢性炎症中的作用及大火草干预的研究［J］. 中国全科医学，2022.［Epub ahead of print］.［www.chinagp.net］

LU L X，SHI H，HUANG Z M，et al. Role of prostasome-derived miRNA-146a in regulating TLR-4/NF-κB pathway and mechanism of Action of Anemone tomentosa in treating chronic inflammation in a rat model of experimental autoimmune prostatitis［J］. Chinese General Practice，2022.［Epub ahead of print］.

Role of Prostasome-derived miRNA-146a in Regulating TLR-4/NF-κB Pathway and Mechanism of Action of Anemone tomentosa in Treating Chronic Inflammation in a Rat Model of Experimental Autoimmune Prostatitis

LU Liangxi[1]，*SHI Hong*[1]，*HUANG Zhimin*[2]，*WANG Wenjie*[1]，*ZOU Han*[3]，*ZHANG Zhiying*[3]，*WU Jinyu*[2*]

1.Department of Andrology，Ren'ai Branch of the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine，Nanning 530001，China

2.Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Preventive Medicine of Traditional Chinese Medicine，First School of Clinical Medicine of Guangxi University of Chinese Medicine，Nanning 530023，China

3.Graduate School，Guangxi University of Chinese Medicine，Nanning 530001，China

[*]*Corresponding author：WU Jinyu，Professor，Chief physician，Doctoral supervisor；E-mail：wujinyu0109@sina.com*

【Abstract】 **Background** It is urgently necessary to find new drugs for chronic prostatitis （CP） as desired

基金项目：广西自然科学基金项目“基于前列腺小体 miRNA-146a/TLR-4/NF-κB 信号通路探讨壮药大火草保护 EAP 大鼠的基础研究”（项目编号：2020GXNSFBA297101）

1.530001 广西壮族自治区南宁市，广西中医药大学第一附属医院仁爱分院男科 2.530023 广西壮族自治区南宁市，广西中医药大学第一临床医学院广西中医药防治医学分子生物重点实验室 3.530001 广西壮族自治区南宁市，广西中医药大学研究生院

[*]通信作者：吴金玉，教授，主任医师，博士研究生导师；E-mail：wujinyu0109@sina.com

本文数字出版日期：2023-02-01

treatment effect is still yet to be achieved. Our previous clinical study has found that Anemone tomentosa〔（Maxim.）Pei〕has a good effect on CP，but the specific mechanism of action remains to be further studied. **Objective** To investigate the role of prostasome-derived miRNA-146a in regulating toll-like receptor 4/nuclear factor-κB（TLR-4/NF-κB）pathway and the mechanism of action of Anemone tomentosa in treating chronic inflammation in experimental autoimmune prostatitis（EAP）rats. **Methods** This study was conducted between December 2021 and June 2022. Forty-two Wistar rats were equally divided into seven groups using a random number table，including normal group，model group，low-，medium- and high-dose Anemone tomentosa groups， miRNA-146a mimics and inhibitor groups. After drug intervention，miRNA-146a-5p mRNA in prostasome was detected by real-time polymerase chain reaction，and TLR-4，inhibitor of NF-κB（IκB），phosphorylation of IκB（p-IκB）and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6（TRAF6）protein were detected by western blot，and inflammatory cytokines were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with normal group，the expression level of miRNA-146a-5p mRNA in prostasome was down-regulated in each of the other six groups（P<0.01）. Compared with model group，the expression level of miRNA-146a-5p mRNA in prostasome was up-regulated in medium- and high-dose Anemone tomentosa groups，and miRNA-146a mimics group（P<0.01），but was down-regulated in miRNA-146a inhibitor group（P<0.01）. In Anemone tomentosa and miRNA-146a mimics groups，the expression levels of TLR-4，p-IκBα and TRAF6 proteins in prostate tissues were significantly down-regulated（P<0.01），the expression levels of IκBα proteins in prostate tissues were significantly up-regulated（P<0.01），and serum levels of TNF-α，interleukin（IL）-6，IL-8 and interferon-γ were significantly down-regulated（P<0.01or P<0.05），indicating that Anemone tomentosa and miRNA-146a mimics significantly reduced the inflammatory cell infiltration and improved the pathological injury in prostate tissue. **Conclusion** Prostasome-derived miRNA-146a can participate in local pathological changes of prostate via regulating the activation of TLR-4/NF-κB pathway in EAP rats. The mechanism of action of Anemone tomentosa inhibiting chronic inflammation in EAP rats may be related to its regulation of prostasome-derived miRNA-146a modulating the TLR-4/NF-κB pathway.

【Key words】 Chronic prostatitis；Prostasome；miRNA-146a；TLR-4；NF-κB

慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征（chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome，CP/CPPS）是泌尿外科、男科常见疾病之一，与细菌感染没有明确的联系，以下尿路症状和慢性疼痛障碍为主要征象，占前列腺炎的90~95%[1]。CP/CPPS涉及复杂的病理生理机制，包括隐性感染、免疫、炎症、神经、内分泌、前列腺内尿反流、氧化应激和心理因素等，且不同因素之间经常交叉影响[2]。由于其病因不明且复杂，单模式治疗在很大程度上是不成功的。因此，CP/CPPS已经过渡到多模式的治疗方法，包括药物和非药物治疗。药物疗法主要包括抗生素、α受体阻滞剂、消炎药、植物疗法等；非药物治疗包括盆底物理治疗、肌筋膜触发点释放、针灸、心理支持、电身体冲击波治疗、局部热疗等[3]。然而，一项系统回顾和荟萃分析研究表明，现代医学目前仍然无法明确CP/CPPS具体的发病机制，且对于CP/CPPS的管理和治疗未达到预期的疗效[4]。近年来，在CP/CPPS的替代疗法中，以草药或草药提取物为形式的中草药因其对前列腺疾病治疗的积极作用而受到关注，显示出其特色优势[5]。本课题组前期研究发现大火草〔Anemone tomentosa（Maxim.）Pei〕能显著改善CP患者临床症状[6]、调节CP模型大鼠炎性因子水平[7]，从而发挥抗前列腺炎的作用。

人类前列腺上皮细胞分泌的前列腺小体是第一个被确定的生殖道膜性囊泡，属于外泌体。前列腺小体的生理病理功能在前列腺疾病中发挥重要作用。基于此，本文采用自身免疫性前列腺炎（experimental autoimmune prostatitis，EAP）模型大鼠，探讨前列腺小体来源的微小RNA-146a（microRNA-146a，miRNA-146a）/Toll样受体4（Toll like receptor 4，TLR4）/核转录因子-κB（Nuclear transcription factors-κB，NF-κB）通路在EAP大鼠前列腺局部慢性炎症中的作用，并给予大火草干预治疗，探讨集“清热祛湿、利尿通淋、益气补肾”功效于一身的单味中药治疗CP/CPPS的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究时间 2021年12月至2022年6月。

1.1.2 实验动物 5只的4月龄SPF级Wistar雄性大鼠，体质量(400±20)g；42只8周龄清洁级Wistar雄性大鼠，体质量（200±15）g。实验大鼠均购自长沙市天勤生物技术有限公司（许可证号：SCXK2019-0013）。饲养于广西中医药防治医学分子生物重点实验室，保持室温18~25 ℃，全价营养、分笼饲养。实验通过广西中医药大学伦理委员会审查（动物伦理审批号：DW20220926-202）。

1.1.3 实验仪器与试剂 实验仪器：透射电子显微镜（HITACHI，HT7800/HT7700），核酸蛋白定量仪(denovix，DS-11)，电泳仪（北京六一公司，DYCZ-24DN型），半干转膜仪系统（ATTO，WSE-4040、AE6675L），

荧光定量PCR仪（BIO-RAD，CFX ConnectTM），生物分光光度计（Eppendorf，BioPhotometer），光学显微镜（OLYMPUS，BX43），超速离心机（Hitachi，CP100MX），酶标仪（BIO-TEK，Elx800）。实验试剂：TLR4抗体（Affinity，AF7017），肿瘤坏死因子受体相关因子6（tumor necrosis factor receptor-associated factor 6，TRAF6）抗体（Affinity，AF5376），磷酸化细胞内抑制性蛋白κBα（phospho-inhibitor of NF-κBα，p-IκBα）抗体（Affinity，AF5002），细胞内抑制性蛋白κBα（inhibitor of NF-κBα，IκBα）抗体（Affinity，AF2002）；miRcute miRNA isolation kit试剂盒（天根生物科技有限公司，Cat# DP501），miRcute miRNA Detection Kit（SYBR Green）试剂盒（天根生物科技有限公司，Cat# FP411），miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒（天根生物科技有限公司，Cat# KR211）；完全弗氏佐剂（Sigma-aldrich），miRNA-146a mimics（吉玛基因），miRNA-146a inhibitor（吉玛基因）；白介素-6（interleukin-6，IL-6）（联科生物，EK306），白介素-8（interleukin-8，IL-8）（联科生物，SEKR-0014），干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）（联科生物，EK380），肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor，TNF-α）（联科生物，EK382）。

1.2 实验方法

1.2.1 EAP大鼠模型制备[8] 42只8周龄雄性Wistar大鼠，体质量（200±15）g，采用随机数字表法分为7组，包括正常组、模型组、miRNA-146a mimics组、miRNA-146a inhibitor组、大火草低剂量组、大火草中剂量组、大火草高剂量组，每组6只。除正常组外，其他各组分别于第0、30天，在大鼠多处皮下注入大鼠前列腺蛋白提纯液与弗氏完全佐剂等比混匀的混悬液1 ml，同时腹腔注射百白破疫苗0.5 ml。前列腺组织可见大量炎症细胞浸润，腔内黏膜皱襞消失，腺泡破坏，间质肿胀明显，表明模型成功[9]。

1.2.2 干预措施 造模成功后，正常组与模型组给予0.9%的氯化钠溶液4 ml/kg·d灌胃；大火草低、中、高剂量组予浓度1.46 g/ml、2.92 g/ml、5.84 g/ml大火草煎液4 ml/kg·d灌胃。以上给药每天一次，连续给药4周。miRNA-146a mimics组，给予0.9%的氯化钠溶液4 ml·kg^{-1}·d^{-1}灌胃4周，并于实验取材前72 h鼠尾静脉内注射miRNA-146a mimics 0.2 μl/g；miRNA-146a inhibitor组，给予0.9%的氯化钠溶液4 ml·kg^{-1}·d^{-1}灌胃4周，并于实验取材前72 h鼠尾静脉内注射miRNA-146a inhibitor 0.2 μl/g[10]。

1.2.3 大火草煎剂制备 适量大火草置于煎煮容器内，加相当于药材量5~8倍的冷水浸泡1 h，煮沸30 min，滤过；药渣加3~6倍量水继续煎煮，煮沸30 min，滤过。合并两次煎出药液，离心10 min（离心半径10 cm，转速5 000 r/min），取上清液，利用旋转蒸发器在水浴上浓缩至含生药量5.84 g/ml。灌胃前用蒸馏水配至浓度为1.46 g/ml，相当于人和动物间按体表面积折算的等效剂量的1倍。

1.2.4 大鼠前列腺蛋白提纯液的制备[8] 5只4月龄SPF级Wistar雄性大鼠，体质量（400±20）g，采用1%戊巴比妥钠注射液全身麻醉，消毒后固定在超净台上，从下腹部逐层剪开，并暴露前列腺后剪下，用冷0.9%的氯化钠溶液将剪下的前列腺组织洗净后剪碎，加入含0.5% TritonX-100等重的0.9%的氯化钠溶液（预先高温灭菌）制成匀浆，将匀浆液置入高速离心机中以离心30 min（离心半径10 cm，转速15 000 r/mim），过程保持4 ℃，取上清液0.2 ml，等比稀释后用酶标仪检测浓度。取余下的上清液加入0.1 mol/L pH 7.2的PBS缓冲液把蛋白提纯液稀释成60 g/L的浓度，放入冷冻管保存备用（-80 ℃）。

1.2.5 前列腺组织病理HE染色 使用10%甲醛溶液固定好前列腺组织，石蜡包埋、切片，苏木素-伊红染液染色后，封片，在光学显微镜下观察前列腺组织病理改变。

1.2.6 前列腺液中前列腺小体电镜观察 采用超速离心法提取前列腺液中前列腺小体，超速离心过程：在37 ℃中速融样本，将样本移动至一个新的离心管内，4 ℃离心30 min（离心半径8.1 cm、转速4 700 r/min）；将上清液移至新的离心管中，4 ℃离心45 min（离心半径8.1 cm、转速10 000 r/min），以去除较大的囊泡；取上清，经0.45 μm滤膜过滤，收集过滤液；将过滤液移至新的离心管中，选择超速转子，4 ℃超速离心70 min（离心半径7.2 cm、转速112 000 r/min）；去除上清，用10 ml预冷的1×PBS重悬后，选择超速转子，4 ℃超速离心70 min（离心半径7.2 cm、转速112 000 r/min）；去除上清，用100 μl预冷的1×PBS重悬，取10 μL电镜备用，剩余外泌体于-80 ℃保存。吸取备用样品10 μl滴加于铜网上沉淀1 min，滤纸吸去浮液；醋酸双氧铀10 μl滴加于铜网上沉淀1 min，滤纸吸去浮液；常温干燥5 min后，透射电镜下观察。

1.2.7 前列腺小体miRNA-146a-5p mRNA表达的检测 采用超速离心法提取大鼠前列腺小体，吸取样品200 μl，加入等体积裂解液MZ，按照miRcute miRNA isolation kit试剂盒说明书提取总RNA，参照miRcute miRNA Detection Kit（SYBR Green）试剂盒说明书操作进行反转录（反应条件：37 ℃ 60 min，37 ℃ 60 min）。RT-PCR仪扩增，以U6作内参对照，采用$2^{-\triangle\triangle CT}$法进行数据的相对定量分析。PCR反应条件：94 ℃预变性2 min，1个循环，94 ℃变性20 s，40个循环，60

℃退火 34 s，40 个循环。

1.2.8 前列腺组织 TLR-4、IκB、p-IκB、TRAF6 蛋白表达的检测 取 50 mg 大鼠前列腺组织剪碎后于液氮中研磨至细粉末状，分装于离心管中，加入 500 ul 的 RIPA 裂解液，提取总蛋白。按 Western Blot 操作步骤进行电泳、转膜，并进行 TLR4 抗体（1∶1000），TRAF6 抗体（1∶1000），p-IκBα 抗体（1∶1000），IκBα（1∶1200）免疫检测，成像仪中曝光、拍照。蛋白表达量 = 目的蛋白灰度值 / 内参灰度值。

1.2.9 ELISA 法检测大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-8、IFN-γ 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 TNF-α、IL-6、IL-8、IFN-γ 浓度。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件作统计分析。符合正态分布并且方差齐的计量资料，以（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验；不符合正态分布的计量资料以〔M（QR）〕表示，两组间比较采用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠前列腺组织 HE 染色结果 光学显微镜下观察，与正常组比较，模型组前列腺组织损伤严重，腺腔形状极其不规则，变形严重；部分腺泡上皮细胞胞核固缩、坏死；腺泡间质出血严重，有轻度炎症细胞浸润。与模型组比较，miRNA-146a mimics 组前列腺组织结构轻度损伤，腺体结构略显紊乱；部分前列腺上皮细胞坏死，脱落；无明显炎症细胞浸润；miRNA-146a inhibitor 组前列腺组织结构损伤严重，腺体结构紊乱，腺腔区域变小，部分上皮细胞脱落至管腔；间质有大量红细胞，少量炎症细胞浸润。大火草低剂量组前列腺组织结构有较明显损伤，腺体结构紊乱，腺腔形态不规则，部分上皮细胞坏死；腺泡间质结缔组织有明显出血及中度炎症细胞浸润；大火草中剂量组前列腺组织有较明显损伤，腺体结构紊乱，腺腔形态不规则、变小；腺泡间质少量炎症细胞浸润；大火草高剂量组前列腺组织有轻度损伤，大部分腺泡上皮细胞排列整齐，腺腔形状规则，少量上皮细胞增生；腺泡间质有疏松的结缔组织，其间有成纤维细胞等，无炎症细胞浸润，见图 1。

2.2 各组大鼠前列腺液中前列腺小体电镜观察 大鼠前列腺小体为直径 30~150 nm 的膜性囊泡，电镜下可观察到典型的“杯盘”形态。各组大鼠前列腺液中均观察到前列腺小体，见图 2。

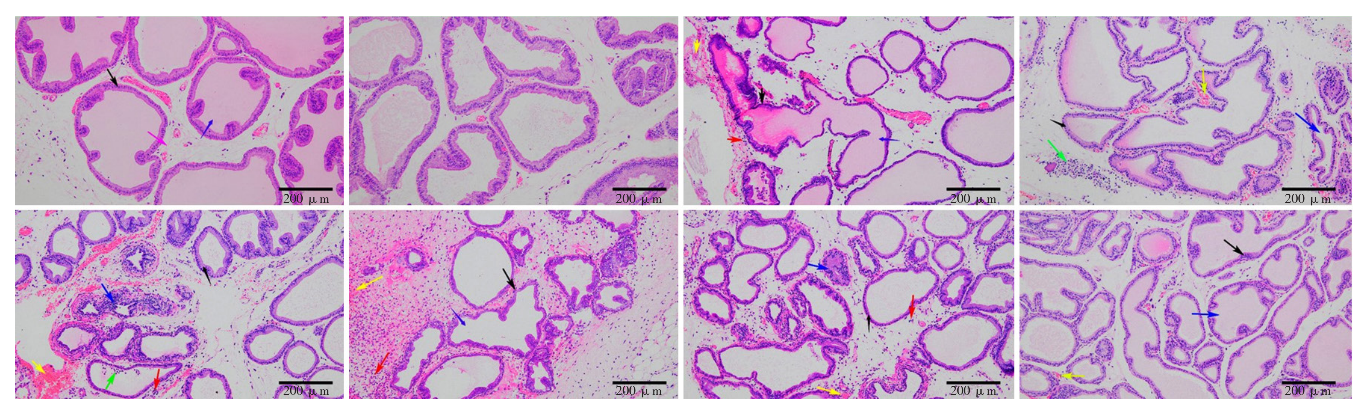
2.3 各组大鼠前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达的结果 结果显示，与正常组比较，各组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达均下调，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组比较，大火草中、高剂量组，miRNA-146a mimics 组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达均上调，差异有统计学意义（$P<0.01$）；miRNA-146a inhibitor 组前列腺小体 miRNA-146a-5p mRNA 表达下调（$P<0.01$），见表 2。

表 1 RT-PCR 检测引物设计

Table 1 Design of primer sequence for RT-PCR detection

基因	引物
miRNA-146a-5p	5′-TGAGAACTGAATTCCATGGGTT-3′
U6	5′-CGCAAGGATGACACGCAAAT-3′

2.4 各组大鼠前列腺组织 TLR-4、TRAF6、IκBα、p-IκBα 蛋白表达的结果 研究结果提示，与正常组比较，各组前列腺组织 TLR-4 蛋白表达均上调，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组比较，miRNA-146a mimics 组、大火草低中高剂量组前列腺组织 TLR-4 蛋白表达均降低（$P<0.01$），且大火草高剂量组降低最显著；miRNA-146a inhibitor 组升高（$P<0.05$）。与正常组比较，



注：A、B 为正常组，C 为模型组，D 为 miRNA-146a mimics 组，E 为 miRNA-146a inhibitor 组，F 为大火草低剂量组，G 为大火草中剂量组，H 为大火草高剂量组；黑色箭头示前列腺上皮细胞，蓝色箭头示前列腺腺泡，黄色箭头示红细胞，红色箭头示炎细胞浸润，粉色箭头示间质，绿色箭头示脱落细胞

图 1 大鼠前列腺组织 HE 染色结果（×100）

Figure 1 Results of H&E staining of prostate tissues in seven groups of rats

各组前列腺组织 TRAF6 蛋白表达均上调（P<0.01）。与模型组比较，miRNA-146a mimics 组、大火草低中高剂量组前列腺组织 TRAF6 蛋白表达均降低（P<0.01），且大火草高剂量组降低最显著；miRNA-146a inhibitor 组TRAF6蛋白表达有升高趋势，无统计学意义（P>0.05）。与正常组比较，miRNA-146a mimics 组前列腺组织 IκBα 蛋白表达无差异（P>0.05），其余各组前列腺组织IκBα 蛋白表达均下调（P<0.05）。与模型组比较，miRNA-146a mimics 组、大火草高剂量组前列腺组织IκBα 蛋白表达均上调（P<0.01）。与正常组比较，各组前列腺组织 p-IκBα 蛋白表达均上调（P<0.01）。与模型组比较，miRNA-146a mimics 组、大火草低中高剂量组前列腺组织 p-IκBα 蛋白表达均降低（P<0.01），且大火草高剂量组降低最显著；miRNA-146a inhibitor 组升高（P<0.01）。详见表 3、图 3。

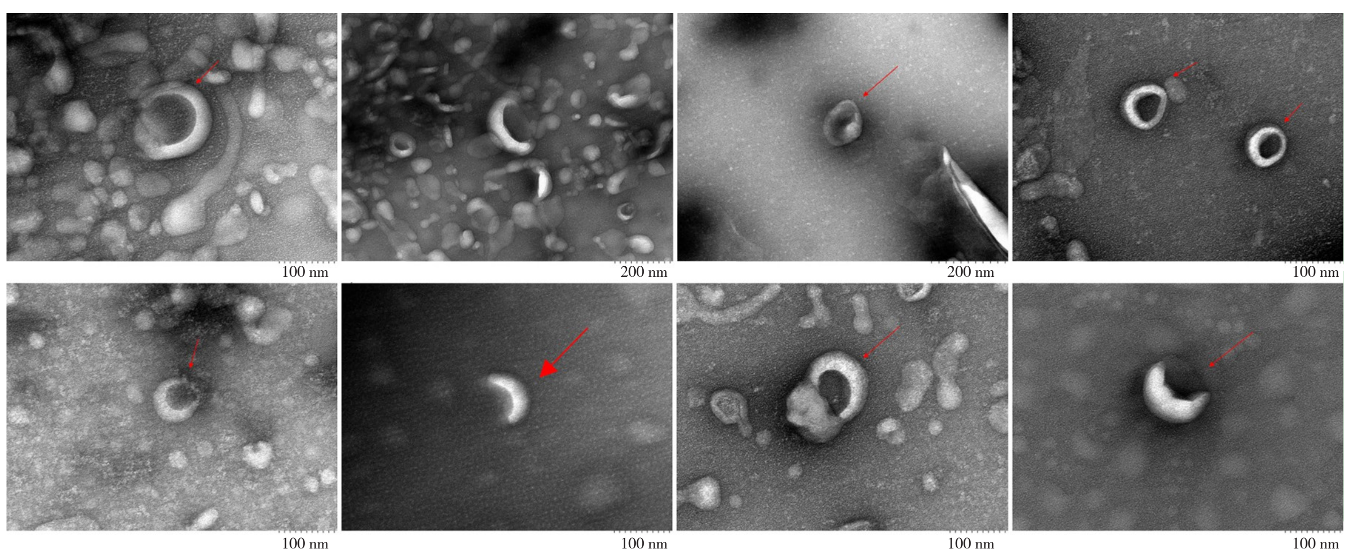
表 2 各组大鼠前列腺小体 miRNA-146a-5p 表达比较分析（$\bar{x} \pm s$）

Table 2 Comparative analysis of miRNA-146a-5p expression levels in prostasome of rats in seven groups

组别	只数	miRNA-146a-5p
正常组	6	1.123 ± 0.140
模型组	6	0.439 ± 0.116[a]
miRNA-146a mimics 组	6	0.848 ± 0.093[ab]
miRNA-146a inhibitor 组	6	0.212 ± 0.028[ab]
大火草低剂量组	6	0.535 ± 0.118[a]
大火草中剂量组	6	0.724 ± 0.105[ab]
大火草高剂量组	6	0.747 ± 0.116[ab]
F 值		45.455
P 值		<0.001

注：[a] 表示与正常组比较，P<0.05；[b] 表示与模型组 P<0.05

2.5 七组大鼠血清 TNF-α、IL-6、IL-8、IFN-γ 水平比较 研究结果提示，与正常组比较，各组大鼠血清 TNF-α 水平均显著升高（P<0.01 或 P<0.05）；与模型组比较，除 miRNA-146a inhibitor 组外，其余各组大鼠



注：A、B 为正常组，C 为模型组，D 为 miRNA-146a mimics 组，E 为 miRNA-146a inhibitor 组，F 为大火草低剂量组，G 为大火草中剂量组，H 为大火草高剂量组

图 2 各组大鼠前列腺液提取的前列腺小体电镜观察（100 kv）

Figure 2 Electron microscopic identification results of prostasome extracted from prostatic fluid of rats in seven groups

表 3 各组大鼠前列腺组织蛋白表达比较分析

Table 3 Comparative analysis of protein expression levels of TLR-4，TRAF6， IκBα and p-IκBα in prostate tissues of rats in seven groups

组别	只数	TLR4〔M（QR）〕	TRAF6〔M（QR）〕	IκBa〔M（QR）〕	p-IκBa（$\bar{x} \pm s$）
正常组	6	0.212（0.050）	0.500（0.052）	0.600（0.019）	0.342 ± 0.043
模型组	6	0.763（0.154）[a]	1.160（0.085）[a]	0.368（0.098）[a]	1.032 ± 0.079[a]
miRNA-146a mimics 组	6	0.350（0.108）[ab]	0.881（0.137）[ab]	0.521（0.135）[b]	0.816 ± 0.042[ab]
miRNA-146a inhibitor 组	6	0.935（0.189）[ab]	1.198（0.238）[a]	0.413（0.123）[a]	1.179 ± 0.079[ab]
大火草低剂量组	6	0.577（0.091）[ab]	0.832（0.160）[ab]	0.432（0.079）[a]	0.777 ± 0.051[ab]
大火草中剂量组	6	0.376（0.055）[ab]	0.755（0.252）[ab]	0.462（0.144）[a]	0.576 ± 0.033[ab]
大火草高剂量组	6	0.286（0.041）[ab]	0.660（0.140）[ab]	0.534（0.063）[ab]	0.456 ± 0.034[ab]
卡方值 /F 值		38.389	35.632	26.330	183.603
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：[a] 表示与正常组比较 P<0.05；[b] 表示与模型组比较 P<0.05

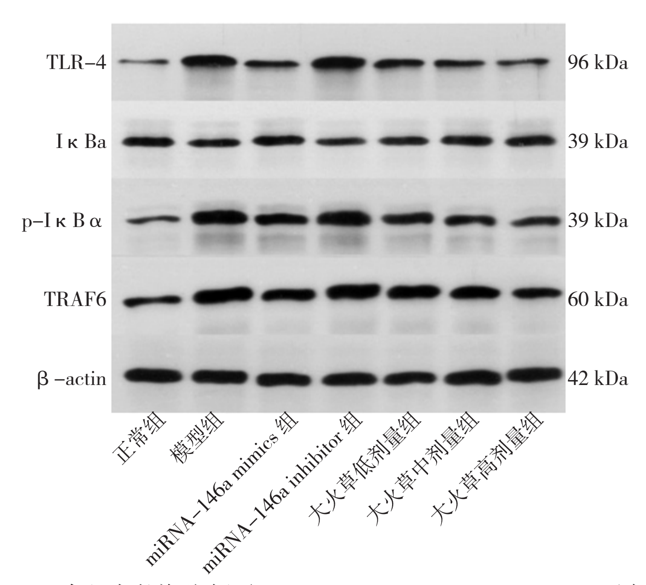


图 3 各组大鼠前列腺组织 TLR-4、IκBa、p-IκBα、TRAF6 蛋白表达

Figure 3 Protein expression levels of TLR-4，IκBα，p-IκBα and TRAF6 in prostate tissues of rats in seven groups

血清 TNFα 水平均显著降低（P<0.01 或 P<0.05）。与正常组比较，除大火草高剂量组外，其余各组大鼠血清 IL-6 含量均显著升高（P<0.01）；与模型组比较，大火草低中高剂量组和 miRNA-146a mimics 组显著降低 IL-6 水平（P<0.01 或 P<0.05）。与正常组比较，除大火草高剂量组外，其余各组大鼠血清 IL-8 水平均升高，有统计学意义（P<0.01）；与模型组比较，除 miRNA-146a inhibitor 组外，其余各组大鼠血清 IL-8 水平均显著降低（P<0.01 或 P<0.05）。与正常组比较，各组大鼠血清 IFN-γ 水平均显著升高（P<0.01 或 P<0.05）；与模型组比较，除 miRNA-146a inhibitor 组、大火草低剂量组外，其余各组 IFN-γ 水平显著降低（P<0.01）。见表 4。

3 讨论

CP/CPPS 症状包括不同程度的慢性盆腔疼痛（前列腺、会阴、尿道）和排尿功能障碍，可显著影响患者的生活质量。据估计中国男性人群中 CP/CPPS 的患病率约为 8.4~25%[11]，并且随着年龄的增长其复发率上升到 50%[12]。根据一项基于循证医学的系统性综述表明[13]，可能轻微减轻 CP/CPPS 症状的主要疗法是：植物疗法、α-阻滞剂、消炎药和抗生素，循证医学证据质量中低，说明目前治疗手段的疗效往往不满意。CP/CPPS 的病因多变、机制复杂导致了其高发病率、难治性、复发性是 CP/CPPS 的主要特点。中草药治疗作为一种有效的替代治疗方法已被广泛应用于 CP/CPPS 的管理，并因其副作用小和多模态效应而引起了研究人员和临床医生的关注[5]。中医学没有明确的 CP/CPPS 相对应病名。医家普遍认为本病本虚标实的病变本质，并认为其发病与“肾虚、湿热、瘀阻”有关[14]。大火草系毛茛科银莲花属多年生草本植物。主要分布于广西、云南等地区，可以说是地道壮药。性味辛微苦、平，有“清热祛湿、利尿通淋、益气补肾”的功效[15]。大火草的功效与 CP/CPPS“肾虚湿热”的基本病机高度切合。本研究旨在解析 CP/CPPS 发生和发展中崭新的分子机制，解释大火草防治 CP/CPPS 的有效性和科学内涵，发掘民族医药治疗 CP/CPPS 优势，为降低该病的复发率和提高该病的治愈率提供理论支持。

miRNA 是一类具有多重功能的非编码 RNA，能够在转录后水平调控基因的表达。TLR 选择性识别病原相关分子模式，构成免疫系统的第一道防线，其信号通路过度激活会导致炎症和相关免疫性疾病的发生，miRNA 可以精细调节 TLRs 信号通路起始、终止、反应强度，参与免疫炎症的发生发展[16]。TRAF6 具有增强促炎性细胞因子基因转录，从而启动炎症级联反应的生物作用，是 TNF 超家族和 TLR 受体超家族的重要结合蛋白[17]。TRAF6 可通过激活 IκB 激酶，促进 IκB 磷酸化及其降解，从而激活 NF-κB 信号通路，是具有正性调节和特异性调控 NF-κB 信号转导的关键因子[18]。已有报道

表 4 各组大鼠血清 TNFα、IL-6、IL-8 及 IFN-γ 水平比较分析（$\bar{x}\pm s$）

Table 4 Comparative analysis of TNFα，IL-6，IL-8 and IFN-γ in serum of rats in seven groups

组别	只数	TNFα	IL-6	IL-8	IFN-γ
正常组	6	19.589±2.334	78.776±6.796	24.696±1.682	34.953±4.613
模型组	6	53.760±8.883^{a}	165.526±19.027^{a}	54.831±8.738^{a}	77.453±14.843^{a}
miRNA-146a mimics 组	6	31.071±5.242^{ab}	104.187±13.447^{ab}	34.788±4.647^{ab}	54.570±6.281^{ab}
miRNA-146a inhibitor 组	6	61.889±6.150^{ab}	181.079±18.012^{a}	62.099±6.097^{ab}	94.530±10.562^{ab}
大火草低剂量组	6	47.137±4.768^{ab}	145.426±15.726^{ab}	46.512±5.846^{ab}	73.483±6.794^{a}
大火草中剂量组	6	38.292±3.514^{ab}	117.838±13.913^{ab}	37.103±4.286^{ab}	59.738±7.556^{ab}
大火草高剂量组	6	27.717±5.198^{ab}	86.934±9.526^{b}	30.117±3.337^{b}	47.082±7.514^{ab}
F 值		45.267	44.909	38.307	30.854
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：^{a} 表示与正常组比较 P<0.05；^{b} 表示与模型组比较 P<0.05

证实 miR-146a 通过靶向 TRAF6 在炎症中发挥作用。研究表明 miRNA-146a 通过抑制 TLR-4/NF-κB 通路的关键分子 TRAF6 的表达，来抑制 NK-κB 的转录活性，并降低其下游炎症因子 IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF-α 的释放，最终起到抑制炎症反应的作用[19]。杨永祥等[20]研究外泌体源性 miR-146a 在 N9 型小胶质细胞内表达升高，并通过调控 TLR4 信号通路中 TRAF6 分子的表达负反馈抑制 N9 型小胶质细胞介导的炎性反应，明显降低 IFN-β、TNF-α、IL-1β 的表达水平。

本研究探讨了 EAP 大鼠前列腺小体源性的 miRNA-146a 对 TLR-4/NF-κB 通路的调控作用，结果表明 miRNA-146a 可以通过抑制 TRAF6 的表达，来抑制 TLR-4、NK-κB 的转录活性，抑制 NF-κB 过度磷酸化，并降低其下游炎症因子 IL-6、IL-8、IFN-γ 和 TNF-α 的释放，减轻前列腺局部炎症反应。通过大火草干预后，可以促进前列腺小体源性 miRNA-146a-5p mRNA 的表达，从而抑制 TRAF6 的表达，进而抑制 TLR-4/NK-κB 通路活化，降其下游炎症因子的释放，减轻前列腺局部炎症反应。随着大火草剂量浓度增加，对前列腺小体源性 miRNA-146a/ TLR-4/NK-κB 通路调控越显著。本研究结果为大火草临床治疗 CP/CPPS 患者提供有力的科学依据。本实验研究样本例数较少，实验结果初步论证了前列腺小体源性 miRNA-146a 可以调节 TLR-4/NF-κB 通路活化参与 EAP 大鼠前列腺局部病理变化，大火草通过干预上述途径发挥抗前列腺炎的作用。提示前列腺小体在 CP/CPPS 发生、发展中具有较好的潜在研究价值，可以作为未来研究的新方向。

作者贡献：陆良喜，吴金玉，黄志敏提出研究的构思与设计，负责研究的实施推进，并进行结果的分析与解释；史宏负责研究设计的可行性分析和实验过程指导；陆良喜负责论文起草；陆良喜、黄志敏负责动物模型的制备、实验指标的检测；邹涵，张知英负责数据收集和整理；王文杰负责统计分析和绘制图表；陆良喜，吴金玉负责最终版本修订，对论文负责。所有作者确认论文终稿。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] FRANCO J V，TURK T，JUNG J H，et al. Pharmacological interventions for treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome［J］. Cochrane Database Syst Rev，2019，10（10）：CD012552. DOI：10.1002/14651858.CD012552.pub2.

[2] FRANCO J V A，TURK T，JUNG J H，et al. Pharmacological interventions for treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome：a Cochrane systematic review［J］. BJU Int，2020，125（4）：490-496. DOI：10.1111/bju.14988.

[3] PENA V N，ENGEL N，GABRIELSON A T，et al. Diagnostic and management strategies for patients with chronic prostatitis and chronic pelvic pain syndrome［J］. Drugs Aging，2021，38（10）：845-886. DOI：10.1007/s40266-021-00890-2.

[4] XUE Y H，DUAN Y Y，GONG X Y，et al. Traditional Chinese medicine on treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome：a systematic review and meta-analysis［J］. Medicine（Baltimore），2019，98（26）：e16136. DOI：10.1097/MD.0000000000016136.

[5] DASHDONDOV O，WAZIR J，SUKHBAATAR G，et al. Herbal nutraceutical treatment of chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome：a literature review［J］. Int Urol Nephrol，2021，53（8）：1515-1528. DOI：10.1007/s11255-021-02868-w.

[6] 陆良喜，吴金玉，黄志敏，等. 壮药大火草保留灌肠治疗慢性前列腺炎 60 例临床观察［J］. 湖南中医杂志，2019，35（6）：55-56. DOI：10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.06.024.

[7] 王文杰，史宏，张静，等. 壮药大火草抑制非细菌性前列腺炎模型大鼠炎症反应［J］. 现代免疫学，2021，41（6）：504-508. DOI: 10.35541/ cjd.20201030.

[8] 钱余，钱小强，贡东卫，等. 白藜芦醇对前列腺炎大鼠模型前列腺组织中细胞因子的干预研究［J］. 中国男科学杂志，2017，31（3）：14-18. DOI：10.3969/j.issn.1008-0848.2017.03.003.

[9] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 慢性前列腺炎动物模型制备规范（草案）［J］. 中国实验方剂学杂志，2018，24（19）：10-14. DOI：10.13422/j.cnki.syfjx.20183002.

[10] 郭健，胡冠宇，钱义明，等. 从 miRNA-146a 调控 TLR-4/NF-κB 通路探讨升降散保护大鼠脓毒症心肌机制的研究［J］. 中国急救医学，2018，38（5）：431-436. DOI：10.3969/j.issn.1002-1949.2018.05.013.

[11] ZHANG J Z，LIANG C Z，SHANG X J，et al. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome：a disease or symptom? current perspectives on diagnosis，treatment，and prognosis［J］. Am J Mens Health，2020，14（1）：1557988320903200. DOI：10.1177/1557988320903200.

[12] KHAN F U，IHSAN A U，KHAN H U，et al. Comprehensive overview of prostatitis［J］. Biomed Pharmacother，2017，94：1064-1076. DOI：10.1016/j.biopha.2017.08.016.

[13] FRANCO J V A，TURK T，JUNG J H，et al. Pharmacological interventions for treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome：a Cochrane systematic review［J］. BJU Int，2020，125（4）：490-496. DOI：10.1111/bju.14988.

[14] 孙自学，李鹏超. 慢性前列腺炎的中医诊疗思路探析［J］. 辽宁中医杂志，2019，46（2）：268-269. DOI：10.13192/j.issn.1000-1719.2019.02.014.

[15] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-9［M］. 上海：上海科学技术出版社，1999：1768，3166.

[16] 胡朝恩，艾智华. miRNA 调控炎症和免疫反应 TLR 信号通路的研究进展［J］. 西南军医，2015，17（1）：76-79. DOI：10.3969/j.issn.1672-7193.2015.01.032.

[17] DOU Y，TIAN X，ZHANG J，et al. Roles of TRAF6 in central nervous system［J］. Curr Neuropharmacol，2018，16（9）：1306-1313. DOI：10.2174/1570159x16666180412094655.

[18] 张群燕，郭郡浩，蔡辉. 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 在 NF-κB 炎症通路中的研究进展［J］. 东南国防医药，2017，19（4）：390-394. DOI：10.3969/j.issn.1672-271X.2017.04.014.

[19] SHARMA N, VERMA R, KUMAWAT K L, et al. MiR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 30. DOI: 10.1186/s12974-015-0249-0.

[20] 杨永祥，崔效玮，叶玉勤，等．外泌体 miR-146a 对 N9 型小胶质细胞介导炎症反应的作用[J]．中华神经外科疾病研究杂志，2018，17（6）：500-503.DOI: CNKI:SUN:SJWK.0.2018-06-006.

[21] 数据可用性声明：支撑本研究的科学数据已在中国科学院数据银行 ScienceDB 公开发布，访问地址为 DOI：10.57760/sciencedb.j00150.00034，CSTR：31253.11.sciencedb.j00150.00034

（收稿日期：2022-10-11；修回日期：2023-12-02）
（本文编辑：徐真）